

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-056361

(43)Date of publication of application : 02.03.1999

(51)Int.Cl.

C12N 15/09  
 A21D 2/14  
 A23L 1/202  
 A23L 1/238  
 C12C 11/02  
 C12G 1/02  
 C12G 3/02  
 C12N 1/19  
 C12P 7/46  
 //(C12N 1/19  
 C12R 1:865 )  
 (C12P 7/46  
 C12R 1:865 )

(21)Application number : 09-218524

(22)Date of filing : 13.08.1997

(71)Applicant : OOZEKI KK

(72)Inventor : HIZUME KAZUHISA  
 OZEKI KENJI  
 HAMACHI MASAOKI  
 KUMAGAI CHIEKO

(54) VARIANT YEAST, ITS BREEDING AND PRODUCTION OF FERMENTED FOOD USING THE SAME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To freely change the quantity of malic acid produced by a yeast and to diversify the production ratio between or among organic acids contained in fermented food, by destroying a gene encoding an isozyme of malic acid dehydrogenase or making it highly expressional.

SOLUTION: The quantity of malic acid produced by a yeast is specifically reduced by partially or wholly deleting malic acid dehydrogenase of the yeast or by destroying a malic acid dehydrogenase gene. The quantity of malic acid produced by a yeast is specifically increased by increasing the malic acid dehydrogenase of the yeast or by amplifying a malic acid dehydrogenase gene. It is preferable to produce fermented food and liquor by employing variant yeasts in which the malic acid dehydrogenase gene (MDH2) is amplified or destroyed.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the  
examiner's decision of rejection or application converted  
registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of  
rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of  
rejection]

[Date of extinction of right]

## \* NOTICES \*

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

CLAIMS

---

[Claim(s)]

[Claim 1] Variation yeast to which the amount of malic acids to produce was made to change freely.

[Claim 2] Variation yeast according to claim 1 with which a part or all of a malic dehydrogenase is missing with yeast, or the malic dehydrogenase gene is destroyed.

[Claim 3] Variation yeast according to claim 1 with which the malic dehydrogenase is increasing or the malic dehydrogenase gene is amplified.

[Claim 4] Variation yeast according to claim 2 or 3 which amplified or destroyed the malic dehydrogenase gene (MDH2).

[Claim 5] Variation yeast claim 1 which is *Saccharomyces cerevisiae* (*Saccharomyces cerevisiae*) – given in 4 any 1 terms.

[Claim 6] *Saccharomyces cerevisiae* FERM Variation yeast according to claim 4 which is P-16348.

[Claim 7] The breeding method of the variation yeast to which the amount of malic acids produced when a part or all of a malic dehydrogenase destroys a deficit or a malic dehydrogenase gene was made to change freely.

[Claim 8] The breeding method of the variation yeast to which the amount of malic acids which produces a malic dehydrogenase by amplifying increase or a malic dehydrogenase gene was made to change freely.

[Claim 9] The breeding method of the variation yeast to which the amount of malic acids produced by amplifying or destroying a malic dehydrogenase gene (MDH2) was made to change freely.

[Claim 10] The manufacture approach of the fermented food characterized by using variation yeast claim 1 – given in 6 any 1 terms.

[Claim 11] The manufacture approach of the alcoholic beverage characterized by using variation yeast claim 1 – given in 6 any 1 terms.

---

[Translation done.]

## \* NOTICES \*

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

DETAILED DESCRIPTION

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the variation yeast to which the amount of malic acids which the yeast used for manufacture of a fermented food produces was made to change freely, its breeding method, and the manufacture approach of a fermented food using it.

[0002]

[Description of the Prior Art] The organic acid in a fermented food giving them an acid taste, and giving flavor which is completely different when it is the important component which influences quality greatly and a presentation and concentration of an organic acid differed from each other is known. Presenting an invigorating acid taste as a description of the taste of a malic acid also in an organic acid is known. With the rise of a request of the consumer to diversification of a fermented food, the breeding technique of a microorganism in which its attention was paid to a presentation and concentration of the organic acid which the microorganism used for fermentation produces is developed in recent years. For example, in JP,3-175975,A, there are a breeding method of the \*\*\*\*\* sake yeast for which the breeding method of the high yeast of the malic-acid productivity which used the inhibitor of the succinic dehydrogenase of yeast, and the manufacture approach of an alcoholic beverage used uncoupler resistance by JP,6-178682,A again, and the manufacture approach of the sake using it. However, any Prior art and the organic acid content which the breeding of yeast which made it increase or decrease freely is impossible, and it increases, or can decrease the concentration which means only a specific organic acid if independent were also little range. Furthermore, neither of the Prior arts is enough as the analysis in a molecular level, and it is not yet clear what kind of gene is participating in organic-acid production of yeast how.

[0003]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] In view of such a situation, a molecular level examines this invention about the gene which participates in organic-acid production of yeast, and it aims at offering the breeding method and the manufacture approach of a fermented food using it to the variation yeast to which the volume of only a specific organic acid was made to change freely in the broad range with an independent technique.

[0004]

[Means for Solving the Problem] this invention persons found out that the malic acid which the yeast produces could be decreased remarkably specifically by destroying the gene which is carrying out the code of the isozyme of the malic dehydrogenase of yeast, as a result of repeating research wholeheartedly about the organic-acid production mechanism of yeast that the above-mentioned purpose should be attained. Moreover, by making the gene which is carrying out the code of the isozyme of malic-acid DEHYDROGENASE high-discover in yeast, this invention persons succeed in making the malic acid which yeast produces increase specifically, and came to complete this invention conversely based on these knowledge. That is, this invention offers the variation yeast to which the amount of malic acids to produce was made to change freely, and the variation yeast with which a part or all of a malic dehydrogenase is missing with yeast, or the malic dehydrogenase gene is destroyed, the variation yeast with which the malic dehydrogenase is increasing or the malic dehydrogenase gene is amplified, and the variation yeast which amplified or destroyed the malic dehydrogenase gene (MDH2) especially are included by this yeast.

[0005] Moreover, the breeding method of the variation yeast to which a part or all of a malic dehydrogenase made the amount of malic acids produced by destroying a deficit or a malic dehydrogenase gene, as for this invention, change freely, And the breeding method of the variation yeast to which the amount of malic acids which produces a malic dehydrogenase by amplifying increase or a malic dehydrogenase gene was made to change freely, The breeding method of the variation yeast to which the amount of malic acids produced by amplifying or destroying a malic dehydrogenase gene (MDH2) especially was made to change freely is offered. Furthermore, this invention offers the manufacture approach of the fermented food characterized by using the variation yeast of this invention, and the manufacture approach of an alcoholic beverage.

[0006]

[Embodiment of the Invention] Although the yeast of this invention is easy to be the thing of the arbitration which exists under the category of yeast in taxonomy, preferably, it will be the yeast belonging to Saccharomyces cervisiae (Saccharomyces cerevisiae), and if it carries out from the purpose of this invention, it will be the yeast used for manufacture of an actual fermented food, for example, sake yeast, beer yeast, wine yeast, baker's yeast, etc., and the monoploid stock and variant which are acquired from these are also included. The gene which carries out the code of the isozyme of the malic dehydrogenase related to volume change of the malic acid in the yeast of

this invention is a gene of the enzyme which participates in malic-acid production of yeast of MDH1 (Biochemistry 27 and 8393 (1988)) and MDH2 of yeast (Mol.Cell.Biol.11,370 (1991)), MDH3 (267 J. Biol.Chem. 24708 (1992)) gene, etc.

[0007] According to this invention, the breeding of the yeast which the malic dehydrogenase of yeast could be made to decrease or suffer a loss, and malic-acid productivity was lost, or decreased in number is possible by destroying the gene which carries out the code of the isozyme of the malic dehydrogenase of yeast. destruction of the gene which carries out the code of the isozyme of the malic dehydrogenase of yeast — the very thing — it can carry out by the well-known approach, for example, a base can be performed to the promoterregion of the gene, and the interior of a coding region addition or by carrying out deletion or carrying out deletion of those whole field. Thus, by destroying the gene which carries out the code of the isozyme of a malic dehydrogenase, the gene in which the capacity to make the isozyme of a malic dehydrogenase discover suffered a loss or decreased can be introduced into the chromosome of yeast by the usual gene engineering transgenics method. or [ that malic-acid productivity was lost by the ability recombination taking place between the gene which carries out the code of the isozyme of the malic dehydrogenase on the chromosome of yeast by the installation, and the introduced gene, and making the malic dehydrogenase of the yeast introduced in the gene decrease or suffer a loss ] — or the lowered breeding of yeast is possible. or [ moreover, / that malic-acid productivity was lost when it was the yeast which made the malic dehydrogenase decrease or suffer a loss ] — or since the breeding of the yeast which decreased-in number is possible, which approach may be used as long as it is the technique of the ability to make the isozyme of the malic dehydrogenase of yeast, such as physical variation, such as chemical variation, such as not only the above-mentioned gene engineering-technique but spontaneous mutation, ethyl methanesulfonate (EMS), etc., and ultraviolet rays, decrease or suffer a loss.

[0008] Magnification of the gene which carries out the code of the isozyme of the malic dehydrogenase of yeast is included in the vector of a request of the above-mentioned gene, and introduces this into yeast. In this case, as an usable vector, all various known things, such as a YRp system, a YEp system, a YCp system, and a YIp system, can be used, for example. Moreover, what is necessary is to build the promotor who is the unit which controls an imprint and a translation in the 5'-upstream region of the above-mentioned gene, and just to build a terminator into a 3'-down-stream region, respectively, in order to make the gene which carries out the code of the isozyme of a malic dehydrogenase in yeast amplify. Although it originates in gene itself which carries out the code of the isozyme of a malic dehydrogenase as this promotor and a terminator, promotors and terminators, such as the alcohol dehydrogenase gene (ADH) of others and yeast, a glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH), a phosphatase gene (PHO), a phosphoglycerate kinase gene (PGK), an enolase gene (ENO), and triosephosphate isomerase (TPI), can be used. Furthermore, the amount of malic acids which yeast produces in proportion to the amount of gene expression which it is possible to make the gene which carries out the code of the isozyme of a malic dehydrogenase control, and to make it discovered, and carries out the code of the isozyme of a malic dehydrogenase in this case can be made to increase by choosing a suitable promotor. Moreover, since the breeding of the yeast which malic-acid productivity increased is possible if it is the yeast to which the malic dehydrogenase was made to increase, which technique to which the isozyme of the malic dehydrogenase of yeast, such as physical variation, such as chemical variation, such as not only the above-mentioned gene engineering-technique but spontaneous mutation, ethyl methanesulfonate, etc., and ultraviolet rays, can be made to increase is sufficient.

[0009] The manufacture approach of the fermented food of this invention and the manufacture approach of an alcoholic beverage can be performed like manufacture of the conventional fermented food and an alcoholic beverage except using the variation yeast of this invention. Especially the class of the fermented food to manufacture or alcoholic beverage may not be limited, and may be sake, Biel, wine, a pan, soy sauce, bean paste, etc. A malic acid increases or decreases specifically, the conventional thing serves as a product with which flavors differed, and the fermented food and alcoholic beverage which are obtained enable diversification of goods.

[0010]

[Example] Although an example is given and this invention is explained in more detail below, this invention is not limited to these.

Cloning of MDH2 was carried out among the genes which carry out the code of the isozyme of a malic dehydrogenase by the PCR method using the primer shown below based on the base sequence of *Saccharomyces cerevisiae* reported to Mol.Cell.Biol.11,370 (1991) by making into a template the chromosome DNA of the cloning sake yeast association No. 7 of the gene which carries out the code of the isozyme of the malic dehydrogenase of example 1 yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

MDH2F 5'GTAGTCCAGAATATAGTGCT 3' MDH2R MDH2 gene carried out 5'TGCTGCATTCTTATGCTTCG 3'

cloning performed electrophoresis after digestion with various restriction enzymes, and it checked that it was the same as that of what the pattern is reported to.

[0011] DNA fragment of 0.8kbp(s) started by Pst1 and EcoR1 from the gene MDH 2 which carries out the code of the isozyme of the malic dehydrogenase which carried out cloning in the construction example 1 of the plasmid for example 2MDH2 gene disruption T4 DNA ligase was used and connected with pUC18, and pUC18MD2 was created. In order to give this a selective marker, after cutting down and flush-end-izing the fragment of 62bp(s) started by TthIII1 and HincII of pUC18MD2, it is started by YEp24 to HindIII. Plasmid for MDH2 destruction which flush-end-izes the DNA fragment which carries out the code of URA3 of 0.75kbp, connects it using T4 DNA ligase, and is shown in drawing 1 pUC18MD2U was created.

[0012] Three to two shares (alpha, ura3) of 7H6-ura(s) which gave uracil demand nature to monoplont stock K-7H6-

1 of the yeast association No. 7 for creation *Saccharomyces cerevisiae* sake of *Saccharomyces cerevisiae* which destroyed example 3MDH2 gene according to the conventional method were created. Plasmid for MDH2 destruction pUC18MD2U was digested by Sph1 and EcoR1, the transformation of three to two shares of 7H6-ura(s) was carried out by the acetic-acid lithium method in the obtained fragment, transformant 7H6-md 2-1 was acquired by having used uracil un-requiring nature as the marker, and it checked that MDH2 gene was destroyed by the Southern-blotting method.

[0013] The gene MDH 2 which carries out the code of the isozyme of the malic dehydrogenase which carried out cloning in the construction example (1) of the plasmid for an example 4MDH2 gene quantity manifestation was phosphorized after flush-end-izing. Moreover, dephosphorization of the HindIII site between the promotor of ADH1 of pAAH5 and a terminator was carried out after flush-end-izing. T4 DNA ligase was used for this place that carried out dephosphorization, the gene obtained above was connected with it, and pAAH5MD2 was created. The part which connected the promotor and terminator of ADH1 with the upstream and the lower stream of a river of a coding region of this pAAH5MD2, respectively was started by BamH1, and the fragment of 3.2kbp(s) was obtained. [ of MDH2 ] T4 DNA ligase was used for BamHof multi-cloning site of pRS4061 site, this was connected with it, and plasmid pRS406AMD2U for an MDH2 gene quantity manifestation shown in drawing 2 was created.

[0014] The transformation of three to two shares (alpha, ura3) of 7H6-ura(s) which used example 5MDH2 gene in the creation example 3 of *Saccharomyces cerevisiae* made to high-discover was carried out by the acetic-acid lithium method by pRS406AMD2U digested by Stu1, and transformant 7H6-MD 2-1 was acquired by using uracil un-requiring nature as a marker. It checked that pRS406AMD2U was incorporated into the URA3 gene on a chromosome by the Southern-blotting method. Moreover, it checked that MDH2 gene was high-discovered by malic dehydrogenase activity measurement. Two to one share of this 7H6-MD is FERM. It \*\*\*\*s to National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology from July 24, Heisei 9 under the trust number of P-16348.

[0015] Like the creation examples 1-3 of *Saccharomyces cerevisiae* which destroyed example 6MDH1 gene and MDH3 gene, based on the base sequence of *Saccharomyces cerevisiae* reported to Biochemistry 27, 8393 (1988), J.Biol.Chem., and 267 24708 (1992), cloning of MDH1 and MDH3 was carried out, respectively among the genes which carry out the code of the isozyme of a malic dehydrogenase by the PCR method, and the plasmid for gene disruption shown in drawing 3 and drawing 4 was built. By this plasmid, the transformation of the monoploid stock of the yeast association No. 7 for *Saccharomyces cerevisiae* sake was carried out similarly, and gene disruption stock 7H6-md 1-1 of MDH1 and MDH3 and 7H6-md 3-1 were acquired; respectively.

[0016] 25 degrees C and stationary culture during six days were performed using production above-mentioned acquisition stock 7H6-md 2-1 of the organic acid in example 7 synthetic medium, 7H6-MD 2-1 (FERM P-16348), 7H6-md 1-1, and 7H6-md 3-1 by YPD15 culture medium (glucose 15% and peptone 2%, 1% of yeast extracts), and component analysis of a culture supernatant was performed. 7H6-URA 3-1 which carried out the transformation of the 7H6-ura 3-2 which is an old stock as contrast by pRS406, and was made into uracil un-requiring nature performed stationary culture similarly, and analyzed the culture supernatant. An analysis result is shown in Table 1. By YPD15 culture medium, stationary culture of the enzyme activity was carried out for two days, it crushed 25 degrees C of acquired yeast-fungus objects with the glass bead, and measured the malic dehydrogenase activity of the cell-free extract according to Lee's and others approach (169 J. Bacteriol. 5157 (1987)).

[0017]

[Table 1]

| 成分分析値       |            |           |           |           |           |
|-------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|             | 7H6-URA3-1 | 7H6-md2-1 | 7H6-MD2-1 | 7H6-md1-1 | 7H6-md3-1 |
| CO2減量 (g)   | 1.84       | 1.76      | 1.82      | 1.85      | 1.83      |
| リンゴ酸 (ppm)  | 289        | 50        | 1039      | 380       | 290       |
| コハク酸 (ppm)  | 127        | 107       | 252       | 82        | 128       |
| 酢酸 (ppm)    | 709        | 672       | 611       | 779       | 707       |
| 酵素活性 (U/mg) | 1.1        | 1.1       | 1.6       | 0.1       | 1.1       |

[0018] Although the enzyme activity of 7H6-md 2-1 which is an MDH2 destructive stock was hardly falling from Table 1 as compared with the old stock, the malic-acid volume decreased to the abbreviation 1/6 of an old stock. On the other hand, although the enzyme activity of 7H6-md 1-1 which is an MDH1 destructive stock fell to 1/10 or less [ of an old stock ], the malic-acid volume did not decrease but was increasing conversely. Moreover, the enzyme activity of 7H6-md 3-1 which is an MDH3 destructive stock is the same as that of an old stock, and increase and decrease were not accepted about malic-acid production. On the other hand, the enzyme activity of 7H6-MD 2-1 which is an MDH2 magnification stock went up by 1.5 times the old stock, and the malic-acid volume was 3.7 or more times of an old stock. In order for MDH2 to have contributed to malic-acid production greatly and to have obtained the desired malic-acid volume from the above thing among malic dehydrogenase isozymes for organic-acid production by yeast, it became clear on gene level that what is necessary is just to destroy thru/or amplify MDH2 gene for the first time.

[0019] By brewing combination as shown in the brewing table 2 of example 8 sake, the sake brewing trial of the 40g

of the total rice was performed using the above-mentioned separation stock 7H6-md 2-1, 7H6-MD 2-1 (FERM P-16348), 7H6-md 1-1, and 7H6-md 3-1. The brewing temperature of goods considered as 15-degree C regularly, filtered mash after ruble on the 16th, and performed component analysis. 7H6-URA 3-1 which carried out the transformation of the 7H6-ura 3-2 which is an old stock as contrast by pRS406, and was made into uracil unrequiring nature was distilled similarly, and performed component analysis. The presentation ratio of main organic acids is shown for an analysis result in Table 3 in Table 4 again.

[0020]

[Table 2]

仕込配合

|         | 水麴 | 初添 | 仲 | 留  | 合計 |
|---------|----|----|---|----|----|
| 総米 (g)  | 2  | 10 |   | 28 | 40 |
| 蒸米 (g)  |    | 4  |   | 28 | 32 |
| 麴米 (g)  | 2  | 6  |   |    | 8  |
| 汲水 (ml) | 12 | 36 |   | 8  | 56 |

[0021]

[Table 3]

成分分析値

|                        | 7H6-URA3-1 | 7H6-md2-1 | 7H6-MD2-1 | 7H6-md1-1 | 7H6-md3-1 |
|------------------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| CO <sub>2</sub> 減量 (g) | 12.4       | 12.9      | 12.4      | 12.6      | 12.7      |
| 滴定酸度 (ml)              | 3.20       | 2.40      | 4.70      | 3.15      | 3.20      |
| アミノ酸度 (ml)             | 2.40       | 2.45      | 2.05      | 2.40      | 2.35      |
| アルコール (%)              | 16.4       | 17.6      | 17.1      | 17.0      | 17.1      |
| リンゴ酸 (ppm)             | 430        | 176       | 1513      | 515       | 427       |
| コハク酸 (ppm)             | 691        | 551       | 678       | 586       | 711       |
| 乳酸 (ppm)               | 644        | 673       | 680       | 492       | 503       |

[0022]

[Table 4]

主要な有機酸の組成比 (%)

|      | 7H6-URA3-1 | 7H6-md2-1 | 7H6-MD2-1 | 7H6-md1-1 | 7H6-md3-1 |
|------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| リンゴ酸 | 20.0       | 10.6      | 47.3      | 28.3      | 23.2      |
| コハク酸 | 32.2       | 33.1      | 21.2      | 32.2      | 38.6      |
| 乳酸   | 30.0       | 40.4      | 21.3      | 27.0      | 27.3      |

[0023] the malic-acid volume of 7H6-md 2-1 which is the same inclination as the result in a synthetic medium, and is an MDH2 destructive stock can decrease to one half extent of an old stock by the presentation ratio, and there are more lactic-acid quantitative ratios than Tables 3 and 4 — soft — \*\*\*\*\* — it turned out that the sake characterized by the mild acid taste is obtained. On the other hand, the malic-acid volume of 7H6-md 1-1 which is an MDH1, destructive stock, and 7H6-md 3-1 which is an MDH3 destructive stock was in the inclination which increases compared with both old stocks by the presentation ratio, and was the almost same sake as an old stock in titratable acidity. On the other hand, the malic-acid volume of 7H6-MD 2-1 which is an MDH2 magnification stock could raise the old stock by the presentation ratio about 2.4 times, could also raise titratable acidity 1.5 times, and was understood that a brewing of the sake characterized by the invigorating acid taste of a malic acid is possible.

[0024] It is reported that will function as a part of glyoxalic acid cycle, and the acetic-acid utilization ability of an MDH2 destructive stock will so be lost as phenotype if the isozyme of the malic dehydrogenase in which the brewing MDH 2 of acquisition of the variant of *Saccharomyces cerevisiae* and sake to which MDH2 suffered a loss from the example 9 acetic-acid utilization ability deficit stock carries out a code grows an acetic acid as a single carbon source (Mol.Cel.Biol.11,370 (1991)). Then, it is the monoplont stock of the yeast association No. 7 for *Saccharomyces cerevisiae* sake. The variant of *Saccharomyces cerevisiae* to which MDH2 suffered a loss against the index in the fall of acetic-acid utilization ability deficit variation and malic-acid productivity was acquired from the K-7H6-1 share. Namely, the cell (about 109 pieces) was suspended in 4.6ml (pH8.0) of 0.1M phosphate buffer

solutions, 0.25ml of 40% glucose solutions, and the solution that mixed EMS0.15ml, and it processed at 30 degrees C for 30 minutes. In order to neutralize EMS, after making it react in 5% sodium-thiosulfate solution for 10 minutes, sterilized water washed twice. Subsequently, it diluted suitably and the YPD plate was made to build about 20,000 colonies after nystatin concentration by making an acetic acid into a carbon source. Then, the replica was carried out to the minimal-medium plate (yeast night ROGEN base 0.67% made from Difco, and glucose 2% or 2% of sodium acetate, 2% of agars, pH5.5) which makes a glucose or an acetic acid a single carbon source, and 176 shares of acetic-acid utilization ability deficit stocks were separated after culture for 30 degree C and six days. Variant to which it cultivated like [ shares / which were separated / 176 ] the example 7, organic-acid analysis was performed about the supernatant, and only the malic-acid volume fell Two shares, 7H6-ad 1-1 and 7H6-ad 1-2, were separated. About 7H6-ad 1-1 and 7H6-ad 1-2, the sake brewing trial was performed like the example 8, and component analysis was performed. An analysis result is shown in Table 5.

[0025]

[Table 5]

成分分析値

|                        | 親株   | 7H6-ad1-1 | 7H6-ad1-2 |
|------------------------|------|-----------|-----------|
| CO <sub>2</sub> 減量 (g) | 12.8 | 12.4      | 12.5      |
| 滴定酸度 (ml)              | 2.50 | 2.00      | 2.10      |
| アミノ酸度 (ml)             | 2.40 | 2.45      | 2.55      |
| アルコール (%)              | 18.1 | 17.6      | 17.8      |
| リンゴ酸 (ppm)             | 295  | 112       | 131       |
| コハク酸 (ppm)             | 427  | 389       | 405       |
| 乳酸 (ppm)               | 573  | 584       | 588       |
| 官能検査の平均値*              | 3.2  | 2.5       | 2.3       |

\* : n = 8、良 1 ~ 5 悪

[0026] One to one share of 7H6-ad acquired from Table 5 by screening by making an acetic-acid utilization ability deficit and a malic-acid volume into an index and one to two shares of 7H6-ad(s) The malic-acid volume is decreasing about to 1/3 to an old stock by the brewing trial of sake like two to one share of 7H6-md which is the MDH2 destructive stock acquired by the gene engineering-technique of an example 8. Also by variation processing, the malic-acid productivity which is the deficit stock of the isozyme of a malic dehydrogenase was low, and the yeast also with low titratable acidity was able to be acquired. the result of the organoleptic test of the sake distilled with such acquired yeast is also good, and soft — \*\*\*\*\* — it turned out that a brewing of the sake characterized by the mild acid taste is possible.

[0027]

[Effect of the Invention] When there are few volumes of a malic acid, for example, it is used for sake brewing by acquiring the deficit stock of this enzyme by destroying MDH2 gene in the gene which carries out the code of the isozyme of a malic dehydrogenase among the enzymes which participate in organic-acid production of the yeast in a fermentation period by this invention, and variation processing, the sake to which the amount of part lactic acids in which the amount of total acids was able to decrease, and in which the malic acid decreased can be made to increase is obtained. By making MDH2 gene amplify on the contrary, the sake brewing to which the amount of malic acids can be made to increase more than by twice becomes possible. By being able to develop the breeding technique of the yeast which can control the desired amount of malic acids, and using such yeast, variety-ization of the organic-acid volume ratio in a fermented food was attained, and diversification of the taste of a new fermented food was attained from the above thing.

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-56361

(43) 公開日 平成11年(1999) 3月2日

|                           |       |                       |
|---------------------------|-------|-----------------------|
| (51) Int.Cl. <sup>8</sup> | 識別記号  | F I N                 |
| C 1 2 N 15/09             | Z N A | C 1 2 N 15/00 Z N A A |
| A 2 1 D 2/14              |       | A 2 1 D 2/14          |
| A 2 3 L 1/202             | 1 0 4 | A 2 3 L 1/202 1 0 4   |
|                           | 1/238 | 1/238 A               |
| C 1 2 C 11/02             |       | C 1 2 C 11/02         |

審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 9 頁) 最終頁に続く

|           |                  |          |                                            |
|-----------|------------------|----------|--------------------------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願平9-218524      | (71) 出願人 | 000204686<br>大関株式会社<br>兵庫県西宮市今津出在家町4番9号    |
| (22) 出願日  | 平成9年(1997) 8月13日 | (72) 発明者 | 樋詰 和久<br>兵庫県西宮市今津出在家町4番9号 大関<br>株式会社総合研究所内 |
|           |                  | (72) 発明者 | 尾関 健二<br>兵庫県西宮市今津出在家町4番9号 大関<br>株式会社総合研究所内 |
|           |                  | (72) 発明者 | 濱地 正昭<br>兵庫県西宮市今津出在家町4番9号 大関<br>株式会社総合研究所内 |
|           |                  | (74) 代理人 | 弁理士 青山 葆 (外1名)<br>最終頁に続く                   |

(54) 【発明の名称】 変異酵母、その育種法およびそれを用いた発酵食品の製造方法

(57) 【要約】

【課題】 単独の技術で幅広い範囲でリンゴ酸の生産量を自由に変化せしめた変異酵母を作出し、食品や酒類の製造に利用する。

【解決手段】 リンゴ酸デヒドロゲナーゼのアイソザイムをコードする遺伝子を破壊または増幅させた変異酵母およびそれを用いる発酵食品、酒類の製造方法。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 生産するリンゴ酸量を自由に変化せしめた変異酵母。

【請求項2】 リンゴ酸デヒドロゲナーゼの一部もしくは全部が欠損しているか、またはリンゴ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子が破壊されている請求項1記載の変異酵母。

【請求項3】 リンゴ酸デヒドロゲナーゼが増大されているか、またはリンゴ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子が増幅されている請求項1記載の変異酵母。

【請求項4】 リンゴ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (MDH2) を増幅または破壊した請求項2または3記載の変異酵母。

【請求項5】 サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) である請求項1～4いずれか1項記載の変異酵母。

【請求項6】 サッカロマイセス・セレビシエ FERM P-16348である請求項4記載の変異酵母。

【請求項7】 リンゴ酸デヒドロゲナーゼの一部もしくは全部が欠損またはリンゴ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を破壊することにより生産するリンゴ酸量を自由に変化せしめた変異酵母の育種方法。

【請求項8】 リンゴ酸デヒドロゲナーゼを増大またはリンゴ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を増幅することにより生産するリンゴ酸量を自由に変化せしめた変異酵母の育種方法。

【請求項9】 リンゴ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (MDH2) を増幅または破壊することにより生産するリンゴ酸量を自由に変化せしめた変異酵母の育種方法。

【請求項10】 請求項1～6いずれか1項記載の変異酵母を用いることを特徴とする発酵食品の製造方法。

【請求項11】 請求項1～6いずれか1項記載の変異酵母を用いることを特徴とする酒類の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は発酵食品の製造に用いられている酵母の生産するリンゴ酸量を自由に変化せしめた変異酵母、その育種方法およびそれを用いた発酵食品の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 発酵食品中の有機酸はそれらに酸味を与え、品質に大きく影響する重要な成分であり、有機酸の組成や濃度が異なると全く異なった風味を与えることが知られている。有機酸の中でもリンゴ酸の味の特徴として、爽やかな酸味を呈することが知られている。近年発酵食品の多様化に対する消費者の要望の高まりと共に、発酵に用いる微生物の生産する有機酸の組成や濃度に着目した微生物の育種技術が開発されている。例えば、特開平3-175975号公報では酵母のコハク酸デヒドロゲナーゼの阻害剤を用いたリンゴ酸生産能の高い酵母の育種方法および酒類の製造方法が、また、特開平6-1

78682号公報では脱共役剤耐性を用いた寡酸性清酒酵母の育種方法とそれを用いた清酒の製造方法がある。しかしながら、いずれの従来の技術も単独では、特定の有機酸のみを意図する濃度に自由に増加または減少させた酵母の育種は不可能であり、また、増加または減少させることが可能な有機酸量も少ない範囲であった。さらに、いずれの従来の技術でも分子レベルでの解析は十分ではなく、どのような遺伝子が酵母の有機酸生産にどのように関与しているのかは未だ明らかではない。

【0003】

【本発明が解決しようとする課題】 このような事情に鑑み、本発明は、酵母の有機酸生産に関与する遺伝子について分子レベルで検討し、単独の技術で幅広い範囲で特定の有機酸のみの生産量を自由に変化せしめた変異酵母と、その育種方法およびそれを用いた発酵食品の製造方法を提供することを目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、上記の目的を達成すべく酵母の有機酸生産機構について鋭意研究を重ねた結果、酵母のリンゴ酸デヒドロゲナーゼのアイソザイムをコードしている遺伝子を破壊することにより、その酵母の生産するリンゴ酸を特異的に著しく減少させることができることを見いだした。また、逆に、本発明者らはリンゴ酸デヒドロゲナーゼのアイソザイムをコードしている遺伝子を酵母中で高発現させることにより酵母の生産するリンゴ酸を特異的に増加させることに成功し、これらの知見に基づいて本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、生産するリンゴ酸量を自由に変化せしめた変異酵母を提供するものであり、かかる酵母には、リンゴ酸デヒドロゲナーゼの一部もしくは全部が欠損しているか、またはリンゴ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子が破壊されている変異酵母と、リンゴ酸デヒドロゲナーゼが増大されているか、またはリンゴ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子が増幅されている変異酵母、特に、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (MDH2) を増幅または破壊した変異酵母が含まれる。

【0005】 また、本発明は、リンゴ酸デヒドロゲナーゼの一部もしくは全部が欠損またはリンゴ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を破壊することにより生産するリンゴ酸量を自由に変化せしめた変異酵母の育種方法、およびリンゴ酸デヒドロゲナーゼを増大またはリンゴ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を増幅することにより生産するリンゴ酸量を自由に変化せしめた変異酵母の育種方法、特に、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (MDH2) を増幅または破壊することにより生産するリンゴ酸量を自由に変化せしめた変異酵母の育種方法を提供する。さらに、本発明は、本発明の変異酵母を用いることを特徴とする発酵食品の製造方法および酒類の製造方法を提供するものである。

【0006】

【発明の実施の形態】本発明の酵母は、分類学的に酵母の範疇にある任意のものでよいが、好ましくは、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) に属する酵母で、本発明の目的からすれば実際の発酵食品の製造に用いられている酵母、例えば、清酒酵母、ビール酵母、ワイン酵母、パン酵母等であり、これらから取得される一倍体株や変異株も包含する。本発明の酵母におけるリンゴ酸の生産量変化に関係するリンゴ酸デヒドロゲナーゼのアイソザイムをコードする遺伝子とは、酵母のMDH1 (Biochemistry 27, 8393 (1988))、MDH2 (Mol. Cell. Biol. 11, 370 (1991))、MDH3 (J. Biol. Chem. 267, 24708 (1992)) 遺伝子等の、酵母のリンゴ酸生産に関与する酵素の遺伝子である。

【0007】本発明によれば、酵母のリンゴ酸デヒドロゲナーゼのアイソザイムをコードする遺伝子を破壊することにより、酵母のリンゴ酸デヒドロゲナーゼを減少または欠損させることができ、リンゴ酸生産能がなくなったか、または減少した酵母の育種が可能である。酵母のリンゴ酸デヒドロゲナーゼのアイソザイムをコードする遺伝子の破壊は、自体公知の方法で行うことができ、例えば、その遺伝子のプロモーター領域や、コード領域の内部に塩基を付加または欠失させたり、それらの領域全体を欠失させることにより行うことができる。このようにしてリンゴ酸デヒドロゲナーゼのアイソザイムをコードする遺伝子を破壊することにより、リンゴ酸デヒドロゲナーゼのアイソザイムを発現させる能力が欠損または減少した遺伝子は、通常の遺伝子工学的な遺伝子導入法により酵母の染色体に導入することができる。その導入により酵母の染色体上のリンゴ酸デヒドロゲナーゼのアイソザイムをコードする遺伝子と、導入した遺伝子の間で組換えが起こり、遺伝子を導入された酵母のリンゴ酸デヒドロゲナーゼを減少または欠損させることができ、リンゴ酸生産能がなくなったかまたは低下した酵母の育種が可能である。また、リンゴ酸デヒドロゲナーゼを減少または欠損させた酵母であれば、リンゴ酸生産能がなくなったかまたは減少した酵母の育種が可能であるので、上記の遺伝子工学的な手法に限らず、自然変異、エチルメタンスルホネート (EMS) 等の化学的変異、紫外線などの物理的変異等の酵母のリンゴ酸デヒドロゲナーゼのアイソザイムを減少または欠損させることができる手法ならばいずれの方法でも良い。

【0008】酵母のリンゴ酸デヒドロゲナーゼのアイソザイムをコードする遺伝子の増幅は上記の遺伝子を所望のベクターに組込んでこれを酵母に導入する。この際に使用可能なベクターとしては、例えば、YRp系、YE p系、YCp系、YIp系等種々の既知のものをすべて用いることができる。また、酵母中でリンゴ酸デヒドロ

ゲナーゼのアイソザイムをコードする遺伝子を増幅させるためには、転写・翻訳を制御するユニットであるプロモーターを上記の遺伝子の5'上流域に、また、ターミネーターを3'下流域にそれぞれ組込めばよい。このプロモーターおよびターミネーターとしては、リンゴ酸デヒドロゲナーゼのアイソザイムをコードする遺伝子それ自身に由来するものの他、酵母のアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子 (ADH)、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (GAPDH)、ホスファターゼ遺伝子 (PHO)、ホスホグリセリン酸キナーゼ遺伝子 (PGK)、エノラーゼ遺伝子 (ENO)、トリオースリン酸イソメラーゼ (TPI) 等のプロモーターやターミネーターを使用することができる。さらに、適当なプロモーターを選択することによりリンゴ酸デヒドロゲナーゼのアイソザイムをコードする遺伝子を制御させて発現させることが可能であり、この場合、リンゴ酸デヒドロゲナーゼのアイソザイムをコードする遺伝子の発現量に比例して酵母の生産するリンゴ酸量を増加させることができる。また、リンゴ酸デヒドロゲナーゼを増加させた酵母であればリンゴ酸生産能が増加した酵母の育種が可能であるので、上記の遺伝子工学的な手法に限らず、自然変異、エチルメタンスルホネート等の化学的変異、紫外線などの物理的変異等の酵母のリンゴ酸デヒドロゲナーゼのアイソザイムを増加させることができるいずれの手法でも良い。

【0009】本発明の発酵食品の製造方法および酒類の製造方法は、本発明の変異酵母を使用する以外は、従来の発酵食品および酒類の製造と同様に行うことができる。製造する発酵食品や酒類の種類は特に限定するものではなく、清酒、ビール、ワイン、パン、醤油、味噌等であって良い。得られる発酵食品や酒類は、リンゴ酸が特異的に増加または減少し、従来のものとは風味が異なった製品となり、商品の多様化を可能にするものである。

#### 【0010】

【実施例】つぎに、実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

##### 実施例1

酵母サッカロマイセス・セレビシエのリンゴ酸デヒドロゲナーゼのアイソザイムをコードする遺伝子のクローニング

清酒酵母協会7号の染色体DNAをテンプレートとして、Mol. Cell. Biol. 11, 370 (1991) に報告されているサッカロマイセス・セレビシエの塩基配列を元に、つぎに示すプライマーを用いてPCR法によりリンゴ酸デヒドロゲナーゼのアイソザイムをコードする遺伝子のうち、MDH2をクローニングした。

```
MDH2F 5' GTAGTCCAGAATATAGTGCT 3'
MDH2R 5' TGCTGCATTCTTATGCTTCG 3'
```

クローニングしたMDH2遺伝子は種々の制限酵素で消化後、電気泳動を行い、そのパターンが報告されているものと同一であることを確認した。

#### 【0011】実施例2

##### MDH2遺伝子破壊用プラスミドの構築

実施例1でクローニングしたリンゴ酸デヒドロゲナーゼのアイソザイムをコードする遺伝子MDH2から、Pst1とEcoR1で切り出される0.8 kbpのDNA断片をpUC18にT4DNAリガーゼを用いて連結し、pUC18MD2を作成した。これに選択マーカーを付与するために、pUC18MD2のTthIII1とHincIIで切り出される62bpの断片を切り出し平滑末端化した後に、YEp24からHindIIIで切り出される0.75 kbpのURA3をコードするDNA断片を平滑末端化し、T4DNAリガーゼを用いて連結し、図1に示すMDH2破壊用プラスミドpUC18MD2Uを作成した。

#### 【0012】実施例3

##### MDH2遺伝子を破壊したサッカロマイセス・セレビシエの作成

サッカロマイセス・セレビシエ清酒用酵母協会7号の1倍体株K-7H6-1に常法に従ってウラシル要求性を付与した7H6-ura3-2株(α, ura3)を作成した。MDH2破壊用プラスミドpUC18MD2UをSph1とEcoR1で消化し、得られた断片で7H6-ura3-2株を酢酸リチウム法により形質転換し、ウラシル非要求性をマーカーとして、形質転換体7H6-md2-1を取得し、MDH2遺伝子が破壊されていることをサザンブロッティング法により確認した。

#### 【0013】実施例4

##### MDH2遺伝子高発現用プラスミドの構築

実施例(1)でクローニングしたリンゴ酸デヒドロゲナーゼのアイソザイムをコードする遺伝子MDH2を平滑末端化後、リン酸化した。また、pAAH5のADH1のプロモーターとターミネーターとの間のHindIIIサイトを平滑末端化後、脱リン酸化した。上記で得られた遺伝子を、この脱リン酸化したところにT4DNAリガーゼを用いて連結し、pAAH5MD2を作成した。このpAAH5MD2のMDH2のコード領域の上流と下流に、それぞれADH1のプロモーターとターミネーターを連結した部分を、BamH1で切り出して3.2 kbpの断片を得た。これをpRS406のマルチクローニングサイトのBamH1サイトにT4DNAリガーゼを用いて連結し、図2に示すMDH2遺伝子高発現用プラスミドpRS406AMD2Uを作成した。

#### 【0014】実施例5

##### MDH2遺伝子を高発現させたサッカロマイセス・セレビシエの作成

##### 実施例3で用いた7H6-ura3-2株(α, ura3)

を、Stu1で消化したpRS406AMD2Uで酢酸リチウム法により形質転換し、ウラシル非要求性をマーカーとして形質転換体7H6-MD2-1を取得した。pRS406AMD2Uが染色体上のURA3遺伝子中に組込まれていることをサザンブロッティング法により確認した。また、MDH2遺伝子が高発現されていることをリンゴ酸デヒドロゲナーゼ活性測定により確認した。この7H6-MD2-1株はFERM P-16348の受託番号の下、平成9年7月24日より工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。

#### 【0015】実施例6

##### MDH1遺伝子、MDH3遺伝子を破壊したサッカロマイセス・セレビシエの作成

実施例1～3と同様に、Biochemistry 27, 8393 (1988)、J. Biol. Chem., 267 24708 (1992)に報告されているサッカロマイセス・セレビシエの塩基配列を元に、PCR法によりリンゴ酸デヒドロゲナーゼのアイソザイムをコードする遺伝子のうち、MDH1およびMDH3をそれぞれクローニングし、図3および図4に示す遺伝子破壊用プラスミドを構築した。このプラスミドで、サッカロマイセス・セレビシエ清酒用酵母協会7号の1倍体株を同様に形質転換して、MDH1とMDH3の遺伝子破壊株7H6-md1-1と7H6-md3-1をそれぞれ取得した。

#### 【0016】実施例7

##### 合成培地での有機酸の生産

上記取得株7H6-md2-1、7H6-MD2-1(FERM P-16348)、7H6-md1-1および7H6-md3-1を用いYPD15培地(グルコース15%、ペプトン2%、酵母エキス1%)で25℃、6日間静置培養を行い、培養上澄の成分分析を行った。対照として親株である7H6-ura3-2をpRS406で形質転換してウラシル非要求性とした7H6-URA3-1も同様に静置培養を行い、培養上澄の分析を行った。分析結果を表1に示す。酵素活性はYPD15培地で25℃、2日間静置培養し、得られた酵母菌体をガラスビーズで破碎し、その無細胞抽出液のリンゴ酸デヒドロゲナーゼ活性をLeeらの方法(J. Bacteriol. 169, 5157 (1987))に従い測定した。

#### 【0017】

##### 【表1】

成分分析値

|                        | 7H6-URA3-1 | 7H6-md2-1 | 7H6-MD2-1 | 7H6-md1-1 | 7H6-md3-1 |
|------------------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| CO <sub>2</sub> 減量 (g) | 1.84       | 1.76      | 1.82      | 1.85      | 1.83      |
| リンゴ酸 (ppm)             | 289        | 50        | 1039      | 380       | 290       |
| コハク酸 (ppm)             | 127        | 107       | 252       | 82        | 128       |
| 酢酸 (ppm)               | 709        | 672       | 611       | 779       | 707       |
| 酵素活性 (U/mg)            | 1.1        | 1.1       | 1.6       | 0.1       | 1.1       |

【0018】表1よりMDH2破壊株である7H6-md2-1の酵素活性は親株に比較してほとんど低下していなかったが、そのリンゴ酸生産量は親株の約1/6まで減少した。これに対してMDH1破壊株である7H6-md1-1の酵素活性は親株の1/10以下まで低下したにもかかわらず、リンゴ酸生産量は減少せず、逆に増加していた。また、MDH3破壊株である7H6-md3-1の酵素活性は親株と同一でありリンゴ酸生産に関しても増減が認められなかった。一方、MDH2増幅株である7H6-MD2-1の酵素活性は親株の1.5倍以上に上昇し、そのリンゴ酸生産量は親株の3.7倍以上であった。以上のことから、酵母による有機酸生産には、リンゴ酸デヒドロゲナーゼアイソザイムのうち、MDH2がリンゴ酸生産に大きく寄与しており、所望のリンゴ酸生産量を得るには、MDH2遺伝子を破壊ないし増幅すればよいことが遺伝子レベルで初めて明らかとなった。

## 【0019】実施例8

## 清酒の醸造

表2に示すような仕込配合で、上記分離株7H6-md2-1、7H6-MD2-1 (FERM P-1634

8)、7H6-md1-1および7H6-md3-1を用いて総米40gの清酒醸造試験を行った。仕込品温は15℃の一定とし、留後16日目にもろみを濾過し、成分分析を行った。対照として親株である7H6-ura3-2をpRS406で形質転換し、ウラシル非要求性とした7H6-URA3-1も同様に醸造し、成分分析を行った。分析結果を表3に、また、主要な有機酸の組成比を表4に示す。

## 【0020】

## 【表2】

|         | 仕込配合 |    |   |    |    |
|---------|------|----|---|----|----|
|         | 水麴   | 初添 | 仲 | 留  | 合計 |
| 総米 (g)  | 2    | 10 |   | 28 | 40 |
| 蒸米 (g)  |      | 4  |   | 28 | 32 |
| 麹米 (g)  | 2    | 6  |   |    | 8  |
| 汲水 (ml) | 12   | 36 |   | 8  | 56 |

## 【0021】

## 【表3】

成分分析値

|                        | 7H6-URA3-1 | 7H6-md2-1 | 7H6-MD2-1 | 7H6-md1-1 | 7H6-md3-1 |
|------------------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| CO <sub>2</sub> 減量 (g) | 12.4       | 12.9      | 12.4      | 12.6      | 12.7      |
| 滴定酸度 (ml)              | 3.20       | 2.40      | 4.70      | 3.15      | 3.20      |
| アミノ酸度 (ml)             | 2.40       | 2.45      | 2.05      | 2.40      | 2.35      |
| アルコール (%)              | 16.4       | 17.6      | 17.1      | 17.0      | 17.1      |
| リンゴ酸 (ppm)             | 430        | 176       | 1513      | 515       | 427       |
| コハク酸 (ppm)             | 691        | 551       | 678       | 586       | 711       |
| 乳酸 (ppm)               | 644        | 673       | 680       | 492       | 503       |

## 【表4】

主要な有機酸の組成比 (%)

|      | 7H6-URA3-1 | 7H6-md2-1 | 7H6-MD2-1 | 7H6-md1-1 | 7H6-md3-1 |
|------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| リンゴ酸 | 20.0       | 10.6      | 47.3      | 28.3      | 23.2      |
| コハク酸 | 32.2       | 33.1      | 21.2      | 32.2      | 38.6      |
| 乳酸   | 30.0       | 40.4      | 21.3      | 27.0      | 27.3      |

## 【0022】

【0023】表3、4より、合成培地での結果と同様な傾向でありMDH2破壊株である7H6-md2-1のリン

ゴ酸生産量は組成比で親株の半分程度まで減少でき、乳酸量比が多い柔らかみのある温和な酸味を特徴とする

清酒が得られることがわかった。これに対してMDH1破壊株である7H6-md1-1とMDH3破壊株である7H6-md3-1のリンゴ酸生産量は組成比で共に親株に比べ増加する傾向にあり、滴定酸度では親株とほぼ同一の清酒であった。一方、MDH2増幅株である7H6-MD2-1のリンゴ酸生産量は組成比で親株の2.4倍近く上げることができ、滴定酸度も1.5倍上昇させることができ、リンゴ酸の爽快な酸味を特徴とする清酒の醸造が可能であることがわかった。

#### 【0024】実施例9

酢酸資化能欠損株よりMDH2が欠損したサッカロマイセス・セレビシエの変異株の取得と清酒の醸造  
MDH2がコードするリンゴ酸デヒドロゲナーゼのアイソザイムは、酢酸を単一炭素源として生育させると、グリオキサル酸サイクルの一部として機能し、それゆえMDH2破壊株は表現型として酢酸資化能がなくなることが報告されている(Mol. Cel. Biol. 11, 370 (1991))。そこで、サッカロマイセス・セレビシエ清酒用酵母協会7号の1倍体株であるK-7H6-1株から酢酸資化能欠損変異とリンゴ酸生産能の低下を指標にMDH2が欠損したサッカロマイセス・セレビシエの変異

株の取得を行った。すなわち、0.1Mリン酸緩衝液(pH8.0)4.6ml、40%グルコース溶液0.25ml、EMS0.15mlを混合した溶液に細胞(約 $10^9$ 個)を懸濁し、30℃で30分処理した。EMSを中和するために5%チオ硫酸ナトリウム溶液中で10分反応させた後、滅菌水で2回洗浄した。ついで、酢酸を炭素源としてナイスタチン濃縮後、適宜希釈し、YPDプレートに約2万個のコロニーをつくらせた。その後、グルコースまたは酢酸を単一炭素源とする最少培地プレート(Difco社製イースト・ナイトロゲン・ベース0.67%、グルコース2%または酢酸ナトリウム2%、寒天2%、pH5.5)にレプリカし、30℃・6日間培養後、酢酸資化能欠損株を176株分離した。分離された176株について実施例7と同様にして培養を行い、その上澄について有機酸分析を行い、リンゴ酸生産量のみが低下した変異株7H6-ad1-1と7H6-ad1-2の2株を分離した。7H6-ad1-1と7H6-ad1-2について、実施例8と同様に清酒醸造試験を行い、成分分析を行った。分析結果を表5に示す。

#### 【0025】

#### 【表5】

|                        | 成分分析値 |           |           |
|------------------------|-------|-----------|-----------|
|                        | 親株    | 7H6-ad1-1 | 7H6-ad1-2 |
| CO <sub>2</sub> 減量 (g) | 12.8  | 12.4      | 12.5      |
| 滴定酸度 (ml)              | 2.50  | 2.00      | 2.10      |
| アミノ酸度 (ml)             | 2.40  | 2.45      | 2.55      |
| アルコール (%)              | 18.1  | 17.6      | 17.8      |
| リンゴ酸 (ppm)             | 295   | 112       | 131       |
| コハク酸 (ppm)             | 427   | 389       | 405       |
| 乳酸 (ppm)               | 573   | 584       | 588       |
| 官能検査の平均値*              | 3.2   | 2.5       | 2.3       |

【0026】表5より、酢酸資化能欠損とリンゴ酸生産量を指標としてスクリーニングを行って取得された7H6-ad1-1株と7H6-ad1-2株は、実施例8の遺伝子工学的手法により取得されたMDH2破壊株である7H6-md2-1株と同様に清酒の醸造試験で親株に対してリンゴ酸生産量が1/3程度に減少しており、変異処理によってもリンゴ酸デヒドロゲナーゼのアイソザイムの欠損株であるリンゴ酸生産能が低く、滴定酸度も低い酵母は取得可能であった。これらの取得された酵母により醸造された清酒の官能検査の結果も良好であり、柔らかみのある温和な酸味を特徴とする清酒の醸造が可能であることがわかった。

#### 【0027】

【発明の効果】本発明により発酵期間中の酵母の有機酸生産に関与する酵素のうち、リンゴ酸デヒドロゲナーゼのアイソザイムをコードする遺伝子の中のMDH2遺伝

子を破壊することおよび変異処理により本酵素の欠損株を取得することによりリンゴ酸の生産量が少ない、例えば、清酒醸造に使用した場合は、総酸量が減少できた、リンゴ酸が減少した分乳酸量を増加させることができる清酒が得られる。反対にMDH2遺伝子を増幅させることにより、リンゴ酸量を2倍以上増加させることができる清酒醸造が可能となる。以上のことより、所望のリンゴ酸量をコントロールできる酵母の育種技術を開発することができ、これらの酵母を使用することにより、発酵食品中の有機酸生産量比のパラエティエー化が可能となり、新たな発酵食品の味の多様化が可能となった。

#### 【図面の簡単な説明】

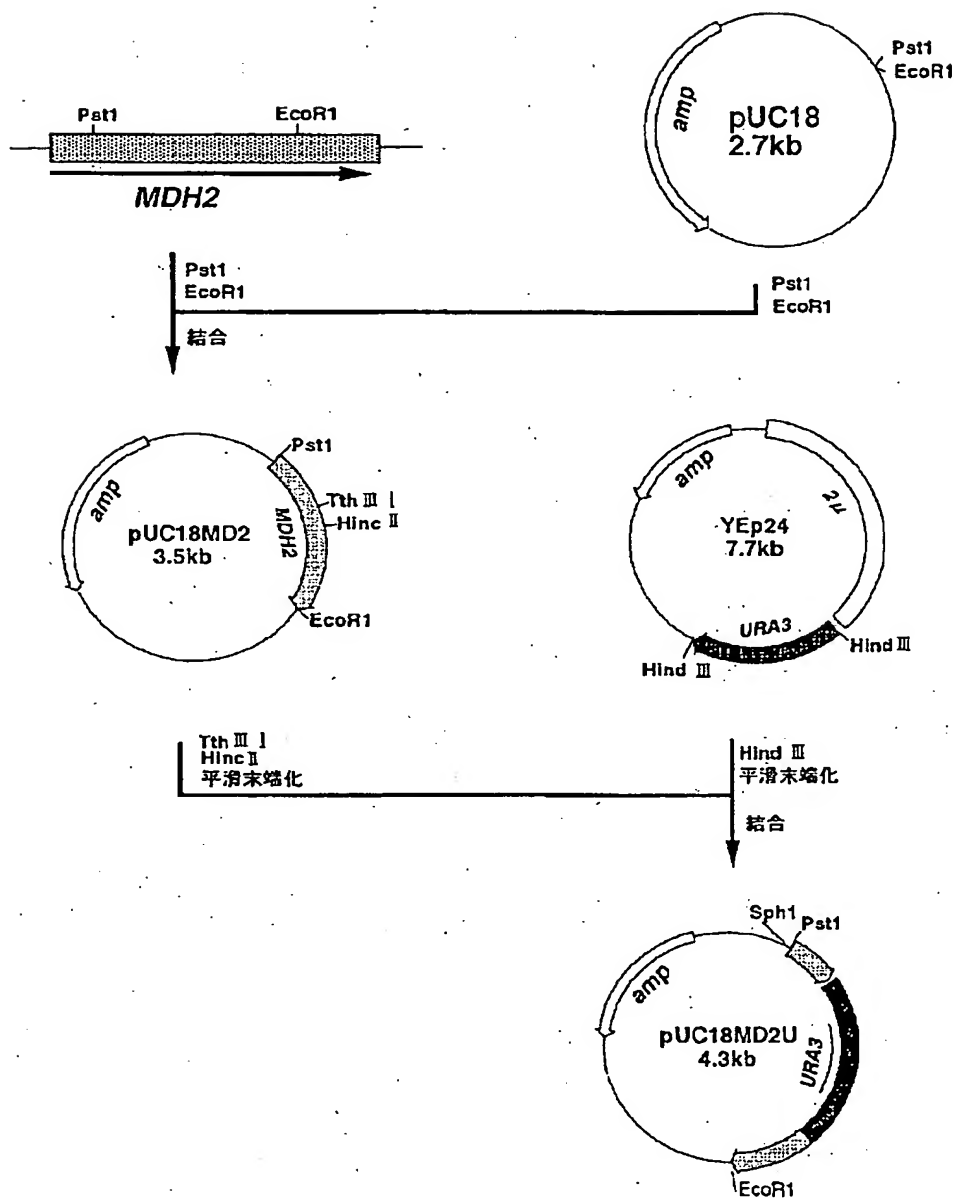
【図1】 実施例2におけるプラスミド作成過程を示す。

【図2】 実施例4におけるプラスミド作成過程を示す。

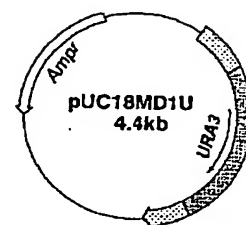
【図3】 実施例6における作成したプラスミドを示す。

【図4】 実施例6における作成したプラスミドを示す。

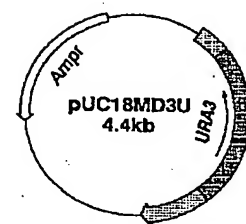
【図1】



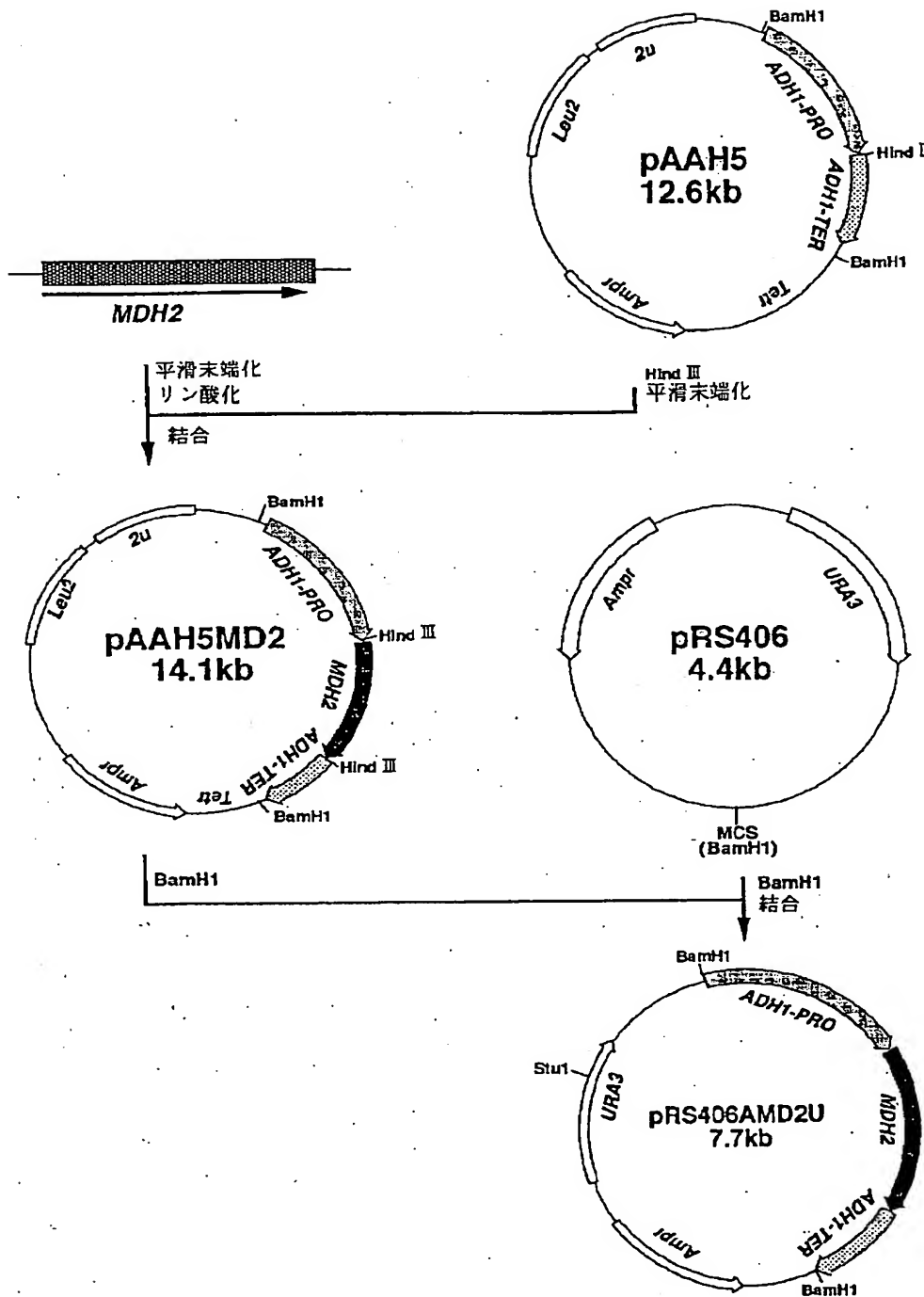
【図3】



【図4】



【図 2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>

識別記号

F I

C 1 2 G 1/02

C 1 2 G 1/02

3/02

1 1 9

3/02

1 1 9 G

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/19

C 1 2 P 7/46

C 1 2 P 7/46

//(C 1 2 N 1/19

C 1 2 R 1:865)

(C 1 2 P 7/46

C 1 2 R 1:865)

(72) 発明者 熊谷 知栄子

兵庫県西宮市今津出在家町 4 番 9 号 大関

株式会社総合研究所内



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**